

배추 기원 Peroxidase의 정제 및 성질

이해익* · 박경숙¹ · 최용순 · 이상영¹

강원대학교 생물응용공학과, ¹식품공학과

Purification and Characterization of Peroxidase from Chinese Cabbage

Rhee, Hae-Ik*, Kyung-Suk Park¹, Yong-Soon Choi and Sang-Young Lee¹

Department of Applied Biology and Technology, and ¹Department of Food Science and Technology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — The distribution of peroxidase activity in 9 kinds of cruciferous plants was investigated. Among the plants examined, peroxidase activity was found to be high levels in roots of Chinese cabbage. One kind of peroxidase was purified approximately 56-fold from crude extracts of Chinese cabbage roots. The molecular weight of the enzyme was 50,000 and consisted of a single polypeptide chain, as estimated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Sephadex G-150 gel column chromatography. The enzyme showed optimum activity at pH 7.0 and 50°C. Phenol and phenol derivatives serves as substrates of the enzyme and Km value for H₂O₂ was 1.6 mM toward pyrogallol. The enzyme showed a Soret band at 406 nm and this result indicate that the enzyme contained heme as a prosthetic group. The immunochemical and electrophoretic properties of purified peroxidase from Chinese cabbage were very similar to horseradish peroxidase.

Peroxidase(donor : hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.7, POX)는 생물계에 보편적으로 존재하는 효소로서 과산화수소를 물로 환원시키며 이때 유기 화합물을 산화시키는 반응을 촉매한다. 본 효소는 효소의 반응이 예민한 점을 이용하여 임상 검사용 시약, enzyme immunoassay 및 monoclonal antibody의 screening assay의 검출용 시약으로 뿐만 아니라 독성 폐기물의 제거에 이용되고 있다. 독성 폐기물의 제거에 있어 산업폐수 중 방향족 amine(1), 석탄 가공 폐수 중의 phenol(2,3), pulp 공장폐수 중의 저분자 색소(4), 음용수 중의 이취 생성 방향족 화합물(5) 등을 POX를 이용하여 실험실 규모에서는 대단히 효율적으로 제거할 수 있다. POX의 이러한 다양한 활용 가능성에도 불구하고 현재 산업적인 이용이 제한되고 있는 것은 주로 효소 활성의 불안정성, 높은 분리 및 정제 비용 등을 열거할

수 있다(6-9).

현재 사용되고 있는 POX는 horseradish 기원의 효소가 주류를 이루고 있으며 POX의 공업적 중요성으로 인하여 horseradish 뿌리의 조직 배양 등을 통한 대량생산이 시도되고 있다(10). 한편으로는 POX 고 생산 균주의 screening이 활발하게 이루어지고 있고 그 중에서 일부는 효소학적 성질(11-13)이 밝혀짐과 동시에 유전자의 단리(14,15)를 통하여 효소를 대량 생산할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 따라서 본 연구에서는 horseradish POX를 대체할 새로운 효소원의 개발을 목적으로 배추 뿌리 기원의 peroxidase의 정제를 통하여 효소학적 특성을 밝힘과 동시에 산업적 이용 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 연구에 사용된 기질인 과산화수소, phenol, 4-aminoantipyrine, pyrogallol은 和光제품을, guaiacol,

Key words: Chinese cabbage, peroxidase

*Corresponding author

acrylamide, DEAE-cellulose, horseradish peroxidase, horseradish peroxidase antiserum(goat)은 Sigma 제품을, Butyl Toyopearl 650 M은 Toyo Soda 제품을, DEAE-Sepharose CL-6B, Sephadex G-150은 Pharmacia 제품을 사용하였다. 기타 시약은 시판 특급 시약을 사용하였다.

시료

POX의 활성 검색을 위한 십자화과 식물로는 1990년 5,6월 춘천 근교의 밭에서 채취한 양배추, 배추, 무, 홍환무, 나도냉이, 다닥냉이, 콩다닥냉이, 갓을 시료로 하였고 식물체의 분류는 대한 식물 도감(16)에 준하였다. 시료의 채취 후 deep freezer에 보관하면서 필요시에 꺼내어 사용하였다.

효소의 정제를 위한 배추의 품종으로는 강원도 평창군 황계리에서 1990년 여름에 재배한 고냉지배추와 1990년 여름에 강원도 춘성군 금산리에서 재배한 서울 봄배추를 시료로 하였다.

효소의 활성측정

Peroxidase의 활성은 4 mM 과산화수소, 1 mM 4-aminoantipyrene, 4 mM phenol, 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) 그리고 적당량의 효소로 구성된 반응액 속에서 효소에 의하여 생성된 quinoneimine의 붉은 색소의 양을 500 nm에서 측정하였다. POX 1 unit는 37°C에서 1분간 1 μmole의 quinoneimine 색소를 생성시키는데 필요한 효소의 양으로 하였으며 quinoneimine의 분자흡광계수(12.2/cm²/μmole)로부터 생성된 색소의 양을 환산하였다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법(17)으로 하였다.

전기영동

Polyacrylamide gel을 이용한 전기영동은 Laemmli의 방법(18)에 의하였다. 전기영동 후 단백질의 위치는 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 확인하였으며, 효소의 활성 염색은 gel을 100 mM potassium phosphate buffer(KPB), 10 mM H₂O₂, 10 mM pyrogallol 용액속에 담그어 37°C에서 약 10분간 incubation하여 POX의 위치를 확인하였다. POX의 활성이 있는 부위는 갈색으로 착색이 된다. 한편 등전점 측정은 Pharmacia사의 Phast-System을 이용한

isoelectrofocusing electrophoresis로 하였다.

분자량 측정

정제된 효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis와 Sephadex G-150 column chromatography(1×90 cm)를 병용하였다.

면역학적 분석

Horseradish peroxidase와의 면역학적 유사성을 검토하기 위하여 horseradish peroxidase에 대한 항체와 정제효소를 0.1 M NaCl을 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 1% agar plate에서 면역확산분석을 행하였다(19). 확산이 끝난 후 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 침강선을 확인하였다.

결과 및 고찰

십자화과 식물에 있어서 POX의 분포

POX를 대량 함유하는 식물체를 screening할 목적으로 일차적으로 horseradish가 분류학적으로 속하여 있는 십자화과 식물 중 한국 자생종 식물 7종을 대상으로 하여 POX의 활성 분포를 검색하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 POX의 활성은 냉이의 뿌리에서 가장 높게 나타났으며 배추의 뿌리에서도 비교적 높은 활성을 나타냈다. 배추의 경우 뿌리에서는 비교적 높은 활성을 나타내었으나 잎 부분에서는 낮은 활성을

Table 1. Distribution of peroxidase activity in cruciferous plants

Sample	Activity (unit/g wet wt.)
Chinese cabbage(배추) leaf	0.06
Chinese cabbage(배추) root	2.36
Cabbage(양배추) leaf	0.54
Cabbage(양배추) root	0.52
Radish(무) leaf	0.17
Radish(무) root	0.09
Radish'pinkball'(홍환무) root	0.18
<i>Barbarea orthoceras</i> (나도냉이) root	0.93
<i>Lepidium apetalum</i> (다닥냉이) root	0.52
<i>Lepidium virginicum</i> (콩다닥냉이) root	0.97
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (냉이) root	3.38
<i>Brassica juncea</i> (갓) root	1.04

나타내었다.

배추 뿌리 peroxidase의 전기영동적 특성

POX의 활성 검색의 결과 냉이의 뿌리가 가장 높은 효소활성을 나타내고 있으나 시료의 대량 확보가 용이한 배추 뿌리를 효소원으로 하였다.

우선 배추 품종간 peroxidase의 isozyme의 분포 양상을 검토하기 위하여 서울 봄배추와 고냉지배추 뿌리의 homogenate 상등액을 시료로 하여 native polyacrylamide gel electrophoresis를 한 후 활성 염색을 통하여 peroxidase isozyme을 확인하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 두 품종간에는 전기영동상으로 상당히 다른 isozyme이 존재함을 알았다. 특히 서울 봄배추의 homogenate에는 10여종의 isozyme이 존재하였다. 한편, 고냉지배추의 경우에는 3종류의 isozyme만을 확인할 수 있었으며 전기영동 양상은 시판 horseradish peroxidase와 유사하였다. 따라서 isozyme의 수가 적고 horseradish peroxidase와 비슷한 전기영동적 특성을 갖는 고냉지배추를 시료로 하여 효소의 정제를 하였다.

Peroxidase의 정제

효소의 추출: 고냉지배추 뿌리 약 200g을 잘게 자른 후 4°C로 냉각한 10 mM Tris-HCl(pH 7.0, 500 mM NaCl 함유) 완충용액을 가하여 Waring Blendor에서 12,000 rpm으로 10초간 6회 파쇄하였다. 파쇄액은 cheese cloth로 여과하여 모으고 잔사는 앞과 같은 방법으로 2회 더 추출하였다. 파쇄 후 여액을 모두 모아 crude extract로 하였다(Total volume 1000 ml).

황산 암모늄에 의한 분별: 효소정제의 각 단계는 4°C 이하에서 행하였다. Crude extract에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 30% 포화농도가 되도록 가한 후 60분간 방치하여 침전을 숙성시킨 후 10,000g로 20분간 원심분리하였다. 소량의 단백질과 배추 뿌리 조직이 침전하였으며 침전에는 효소의 활성이 거의 나타나지 않았다. 원심한 상등액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 90% 포화가 되게 다시 가한 후 60분간 방치하였다. 이를 다시 원심분리하여 단백질 침전을 얻었다. 침전은 소량의 10 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액에 녹인 후 같은 완충용액에 대해 하룻밤 투석하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 제거하였다.

DEAE-Cellulose column chromatography: 앞 단

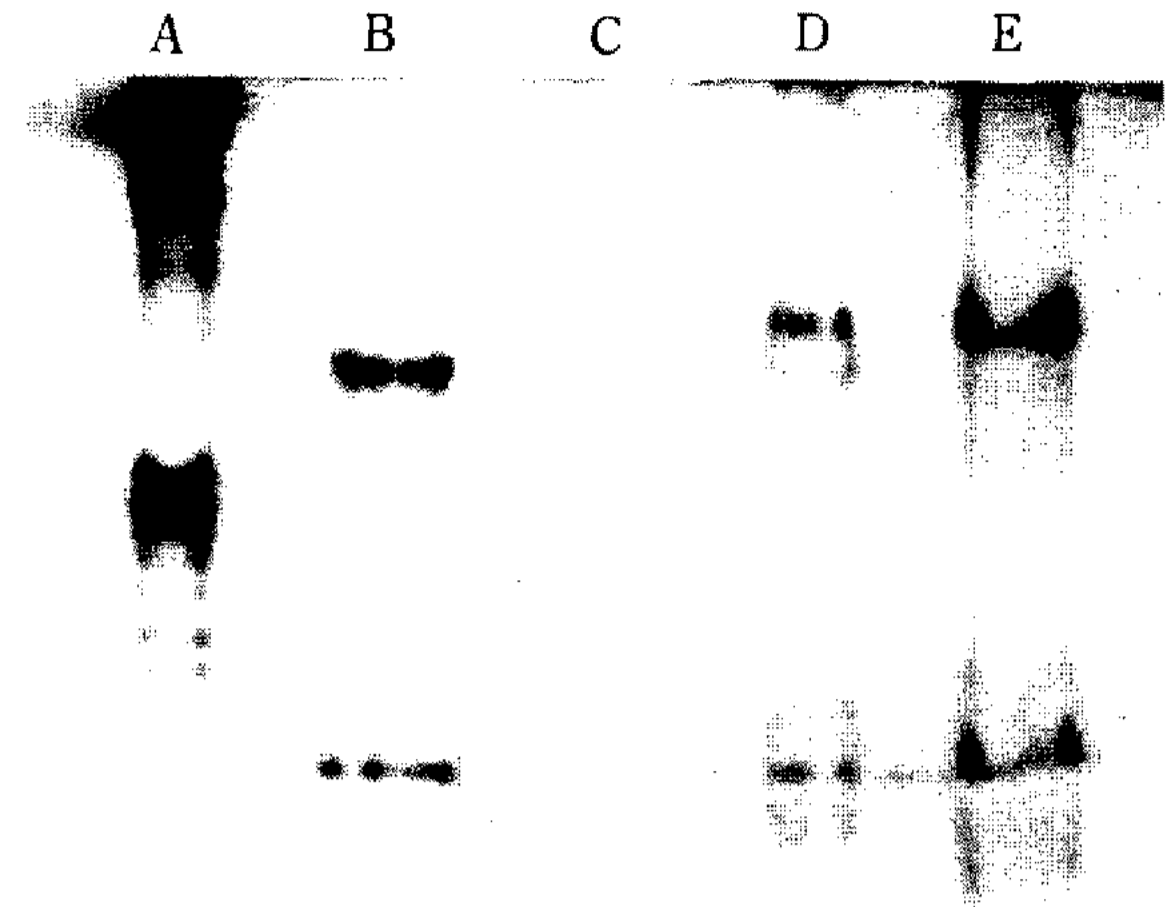


Fig. 1. Electrophoretic pattern of peroxidases in polyacrylamide gel.

Lane A, crude extracts of Seoulbom; B, crude extracts of Gonaengji; C and D, partially purified enzyme from Gonaengji and E, horseradish peroxidase. Activities of peroxidases were stained with pyrogallol.

계의 투석액(105 ml)을 원심분리하여 잔사를 제거한 후 DEAE-cellulose column(4.0×26 cm)에 도입한 후 효소를 linear gradient로 용출하였다(0~1 M NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, total volume 1000 ml). Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 DEAE-cellulose chromatography에 의해 비흡착 부분과 흡착부분의 2개의 fraction으로 분리할 수가 있었다(Fig. 2). 이들 2개의 fraction을 전기영동으로 비교하여 본 결과 fraction I은 활성염색에 의해 염색이 되지 않았다(Fig. 1, lane C). 이는 이들 fraction의 서로 다른 기질 특이성에 기인한 것으로 fraction I은 활성 염색에 사용한 기질인 pyrogallol에 대해 낮은 친화력을 갖는 것으로 판단된다. Fraction II를 모아 다음 정제단계로 넘어 갔다.

Butyl Toyopearl 650 M column chromatography: Fraction II(220 ml)를 모아 ice bath안에서 천천히 교반하면서 분말 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 30% 포화가 되도록 가한 후 1시간 방치한 다음 10,000g에서 원심분리하였다. 원심분리 후 얻어진 상등액을 30% 포화

(NH₄)₂SO₄ 용액으로 평형화시킨 Butyl Toyopearl 650 M column(2.5×14 cm)에 도입하였다. 시료의 도입이 끝난 후 linear gradient로 용출하였다(30~0 % sat. (NH₄)₂SO₄ in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, total volume 300 ml). 활성이 있는 부위를 모아 4°C에서 10 mM Tris-HCl에 대하여 하룻밤 투석하였다(330 ml).

1차 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography : 앞 단계의 투석액(330 ml)을 원심분리하여 잔사를 제거한 후 DEAE-Sepharose column CL-6B(2×26 cm)에 도입하였다. 시료의 도입이 끝난 후 linear gradient로 용출하였다(0~1 M NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, total volume 300 ml). 활성이 있는 부위를 모아 한외 여과막을 이용하여 탈염시킨 후 다음 정제단계로 들어갔다.

2차 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography : 앞 단계의 효소액을 DEAE-Sepharose CL-

6B column(1.2×18 cm)에 도입한 후 70 ml의 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)로 세척한 후 linear gradient로 용출하였다(0~100 mM NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, total volume 200 ml).

배추 뿌리 200g으로부터 peroxidase의 정제과정을 요약하면 Table 2와 같다. 효소정제의 전과정을 통하여 배추 뿌리의 추출액으로부터 56배율, 12%의 활성수율로 정제를 하였다. 마지막 단계에서 얻어진 효소는 Fig. 3, lane A, C에서 나타난 바와 같이 SDS-polyacrylamide gel 전기영동적으로 균질한 단백질이었다.

효소의 성질

본 효소의 분자량을 Sephadex G-150 column chromatography를 통하여 측정하여 본 결과 50,000으로 계산되었으며(Fig. 4), 또한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동상에서도 분자량 50,000의 단일 밴드를 나

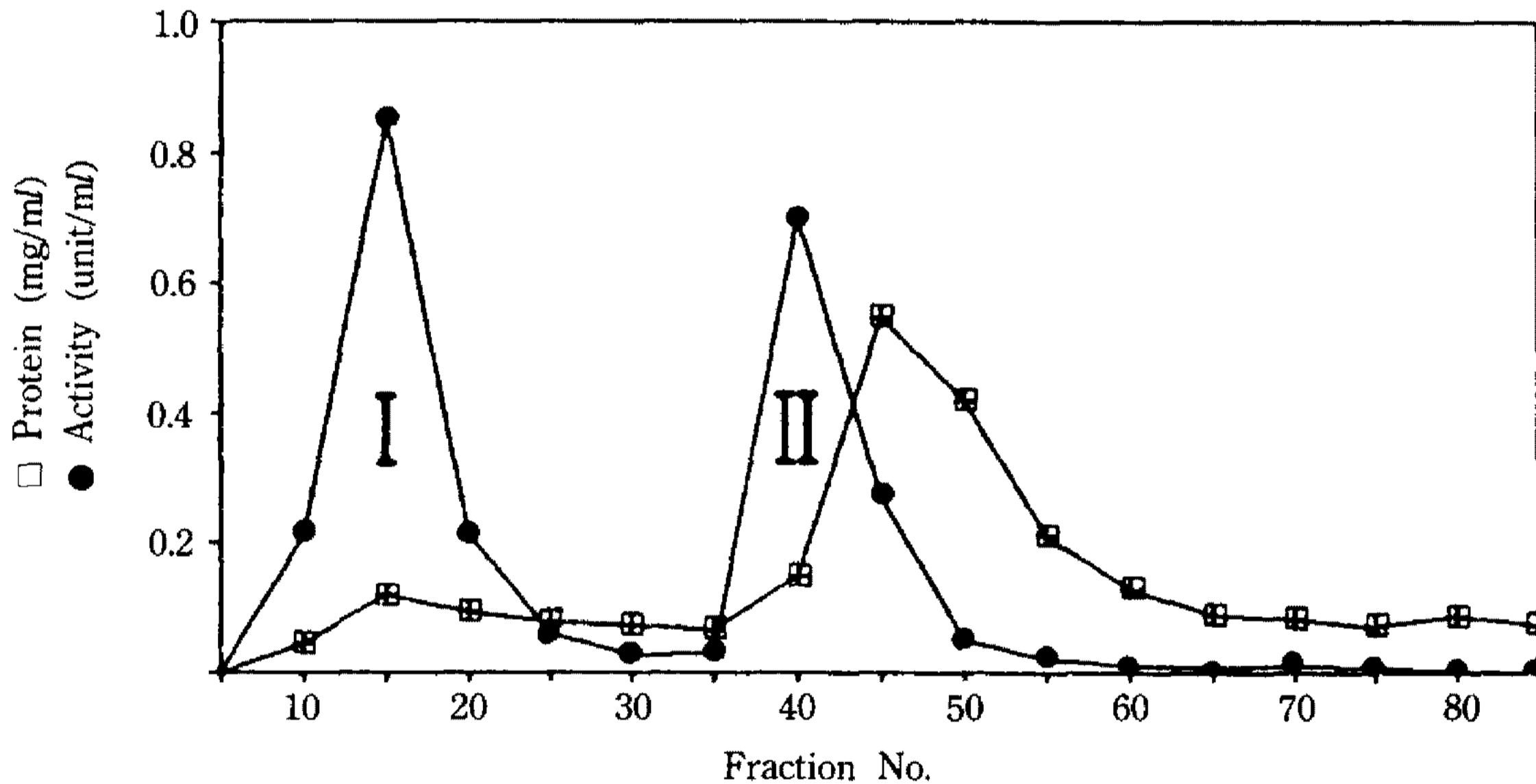


Fig. 2. Elution pattern of peroxidase on DEAE-Cellulose column chromatography. Detailed conditions for the chromatography were as described in the text. Fractions of 12 ml were collected.

Table 2. Purification of peroxidase from Chinese cabbage roots

Step	Protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Crude extracts	923	4075	4.4	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	197	3341	16.9	82	3.8
DEAE-cellulose	157	2223	18.4	55	4.2
Butyl Toyopearl 650 M	26.2	1922	73.4	47	16.7
1st DEAE-Sepharose CL-6B	5.1	766	149	19	33.9
2nd DEAE-Sepharose CL-6B	2.0	492	246	12	55.9

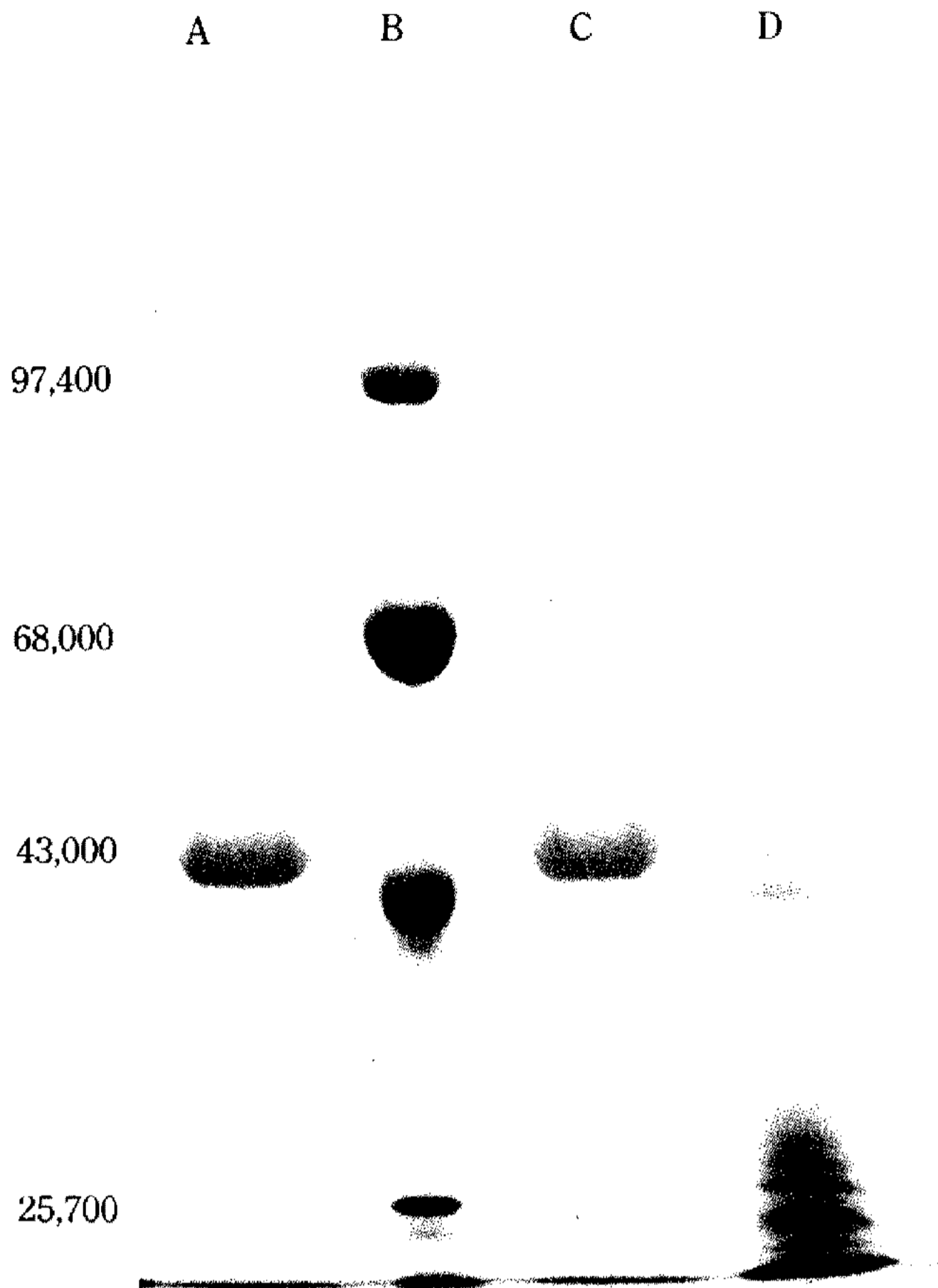


Fig. 3. SDS/Polyacrylamide gel electrophoresis of peroxidase.

The protein samples were treated with SDS in the presence of 2-mercaptoethanol and electrophoresed on SDS/polyacrylamide gel (10%). Lanes A and C, purified peroxidase; lane B, marker protein and lane D, crude extracts.

타내어(Fig. 3, lane A, C) 본 효소는 분자량 50,000의 single peptide임을 알 수 있었다. pI를 달리하는 단백질을 marker protein으로 하여 isoelectrofocusing electrophoresis한 결과 본 효소의 pI는 9.1로 측정되었다.

본 효소에 대한 기질특이성을 검토하기 위하여 여러가지 수소 공여체를 기질로 하여 활성도를 측정하였다(Table 3). 검토한 수소공여체 중에서 pyrogallol이 가장 좋은 기질로 나타났다. Phenol 및 phenol 유도체도 기질로서 작용하였으나 catechol은 기질로서 작용하지 않았다. Guaiacol을 수소공여체로 하여 Velick 등의 방법(20)으로 H₂O₂에 대한 Km값을 구한 결과 1.6 mM이었다. 정제된 효소의 가시광선 영역에서의 흡광스펙트럼을 분석하여 본 결과 406 nm에서 heme기 특유의 Soret 흡수대가 관찰되어(Fig. 5) 본

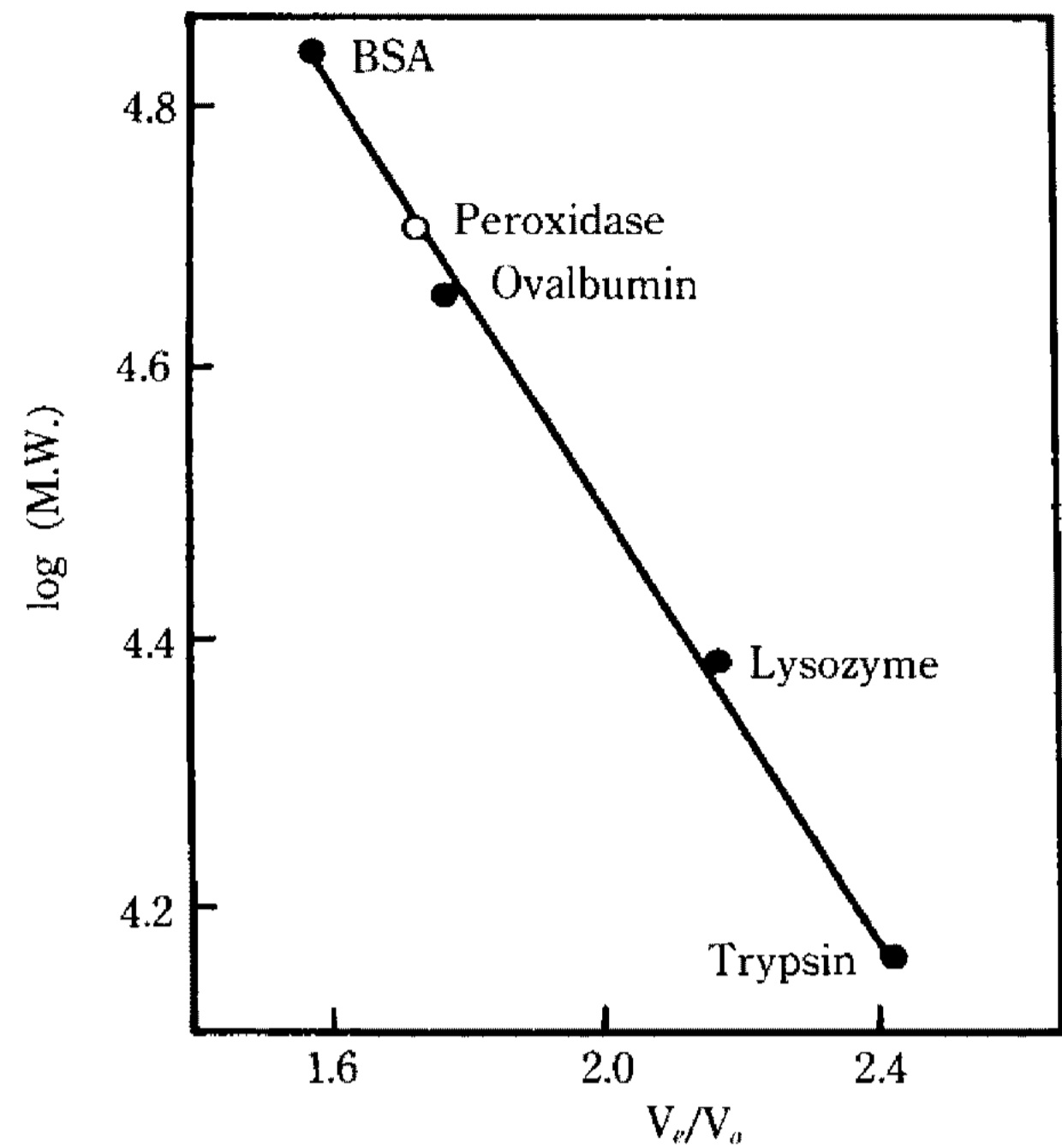


Fig. 4. Determination of the molecular weight of peroxidase by Sephadex G-150 column chromatography.

Table 3. Substrate specificity of peroxidase from Chinese cabbage

Substrate	Relative activity (%)
Dichlorophenol + 4-aminoantipyrine	100
Phenol + 4-aminoantipyrine	32
Pyrogallol	235
Guaiacol	23
Catechol	2.2

Increase in absorbance in 1 min were compared and expressed as relative activity. For dichlorophenol+4-aminoantipyrine, 100% relative activity was 18.6 μmol/min/ml.

효소도 다른 peroxidase와 마찬가지로 분자내에 heme을 가지고 있음을 확인하였다(11, 21-24).

본 효소는 pH 6~8의 넓은 범위에서 높은 활성을 나타내었으며 최적 pH는 7.0이었다. 한편 pH 5.0 이하와 pH 9.0 이상에서는 효소활성이 30% 이하로 급격히 낮아져 중성 부근의 pH에서 본 효소는 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 본 효소의 활성에 대한 온도의 영향은 40°C에서 60°C 사이에서 비교적 높은 활성을 나타내었으며 작용 최적온도는 50°C이었다. 배추 기원 peroxidase의 열안정성을 검토하기 위하여 10 μg의 효소를 40°C에서 80°C까지 각각 가온하면서 5, 10, 20, 30분마다 효소액을 취하여 급냉한 후 잔여

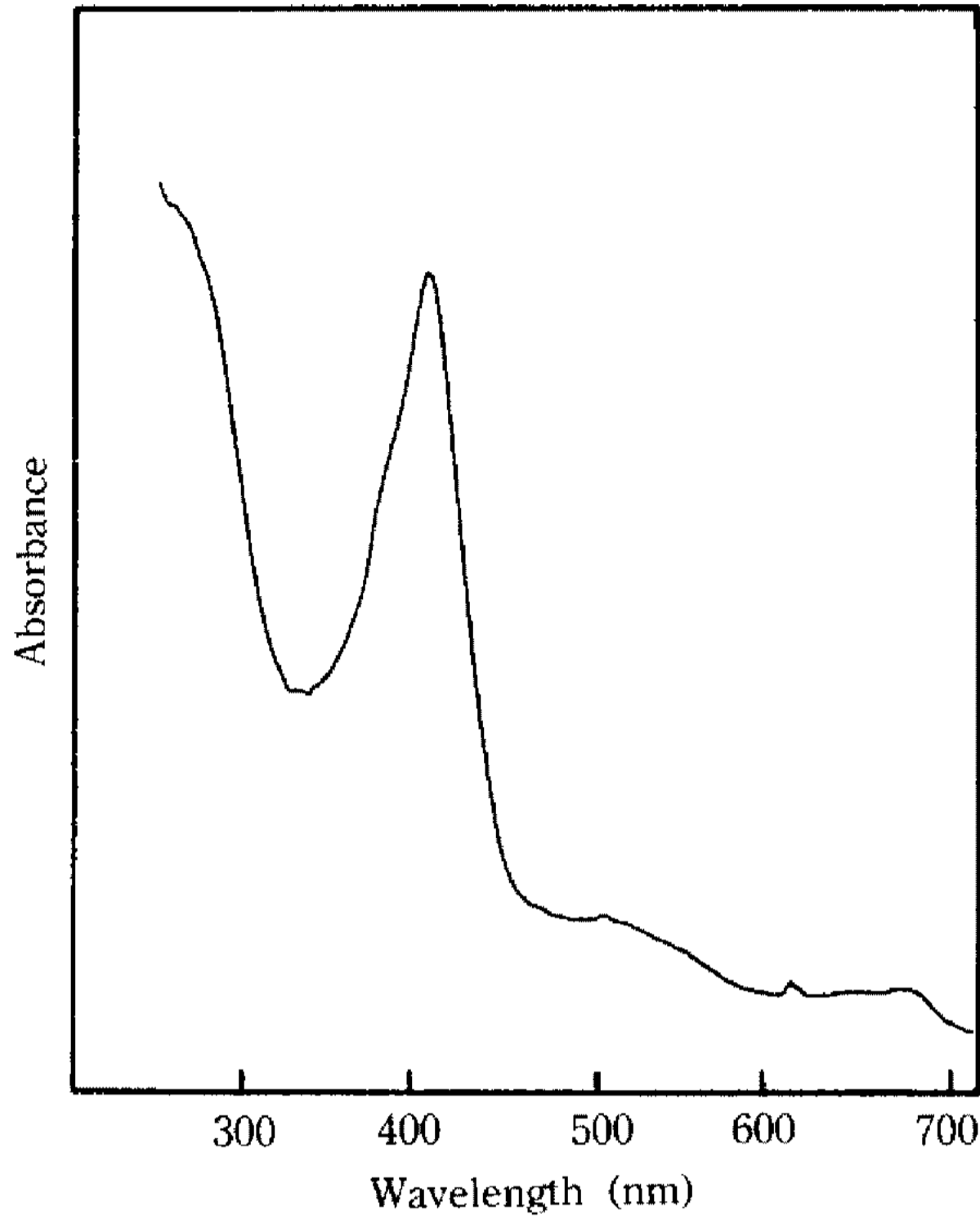


Fig. 5. Ultraviolet/visible absorption spectrum of purified Chinese cabbage peroxidase.

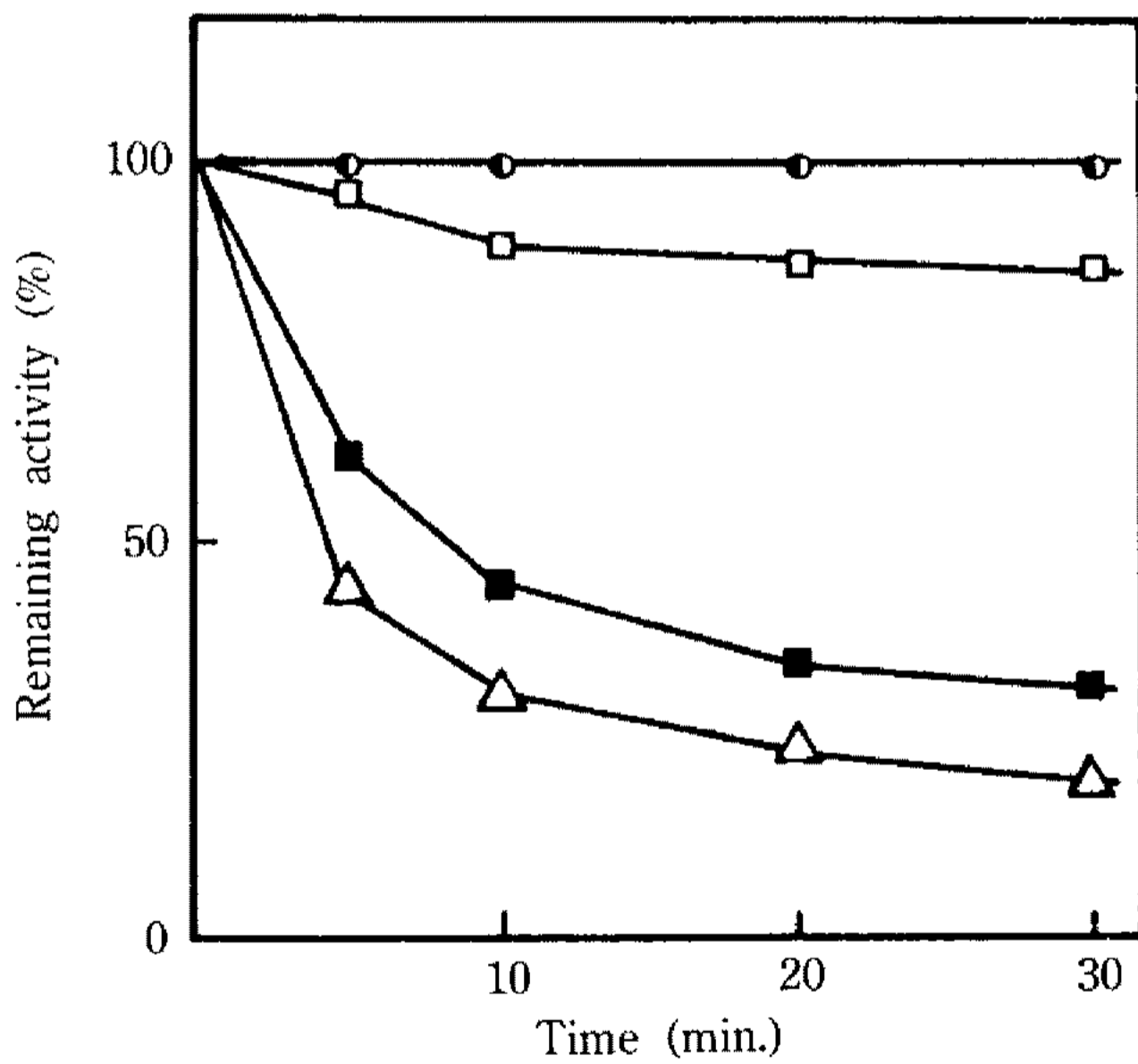


Fig. 6. Effect of temperature on stability of Chinese cabbage peroxidase.

The enzyme (10 μ g) was incubated in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at various temperatures (○, 40°C; ●, 50°C; □, 60°C; ■, 70°C and △, 80°C) for several minutes, and then residual activities were assayed under the standard conditions.

활성을 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 40°C와 50°C의 30분간 가열에 의하여 효소활성의 변화가 없었으나 70°C 이상의 온도에서는 10분간의 가열에 의

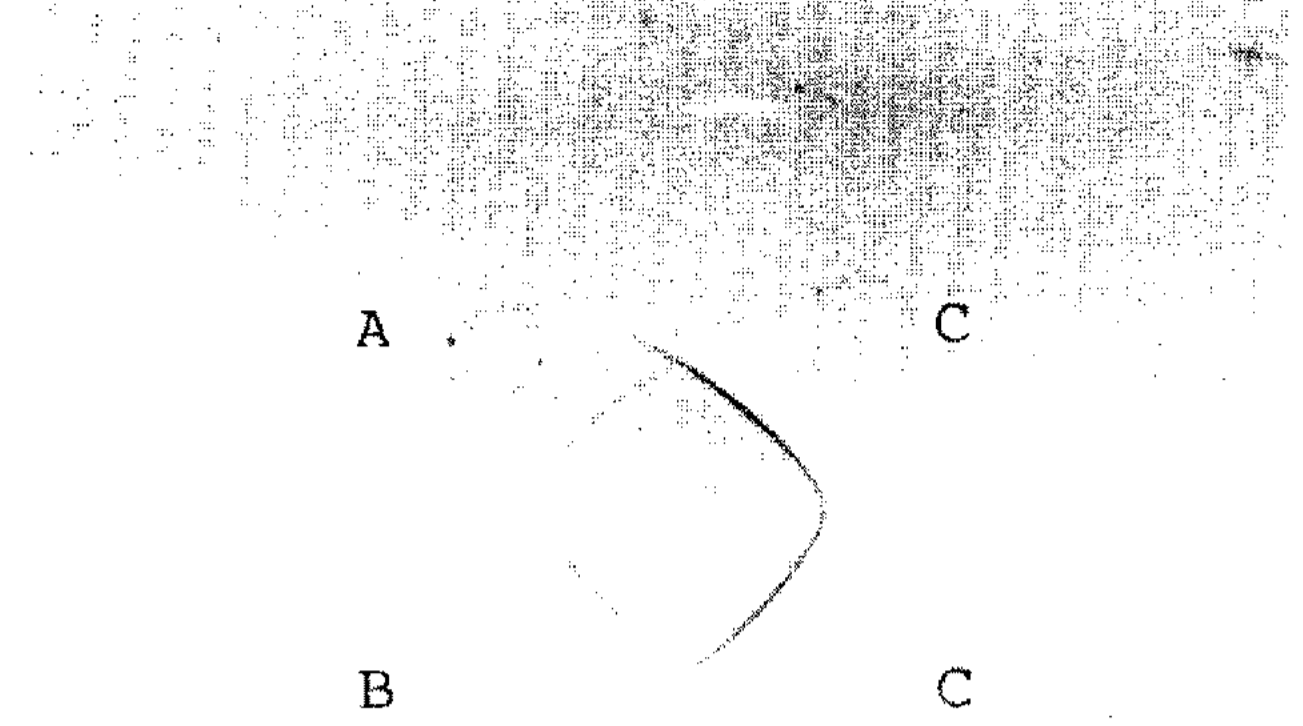


Fig. 7. Ouchterlony double diffusion analysis of peroxidase.

The center well was filled with the antiserum against peroxidase from horseradish and each peripheral well with enzyme solutions: A, crude extracts of Chinese cabbage; B, purified peroxidase from Chinese cabbage and C, horseradish peroxidase.

해서 50% 이상의 효소활성의 감소를 보였다. 따라서 본 효소는 60°C까지의 온도에 대하여는 상당한 내성이 있음을 알 수 있었다.

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 고냉지배추 기원 peroxidase의 native polyacrylamide gel electrophoresis 패턴은 horseradish peroxidase와 유사하였으므로 horseradish 기원의 효소와 면역학적인 유사성을 Ouchterlony immunodiffusion법(19)으로 확인하였다. Horseradish peroxidase에 대한 항혈청과 정제한 효소와의 침강선은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 그림에서 나타난 바와 같이 horseradish peroxidase의 항혈청은 horseradish peroxidase(C Well) 뿐만이 아니라 배추 기원의 peroxidase(A, B well)와도 침강선을 형성하여 두 종류의 peroxidase는 전기영동적 형태 뿐만이 아니라 면역학적으로도 유사한 반응을 나타냄을 알 수가 있었다.

본 연구에서 시도한 배추 뿌리 기원 POX의 개발은 현재 본 연구실에서 연구 중인 cholesterol 정량용 kit (25, 26)를 이루고 있는 효소의 하나일 뿐만이 아니라 여러가지 용도로 폭넓게 이용되고 있는 효소이다(1-5). 이와 같이 유용한 효소의 효소원을 농산 폐기물인 배추 뿌리로 하고 있다는 것은 폐자원을 고부가가치 생산물로 전환시킨다는데 큰 의미를 갖는다. 배추는

우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 채소의 하나로서 매년 약 400만톤 이상이 생산되고 있다. 그러나 배추는 식용 부분으로서 주로 지상부분만을 이용하고 뿌리 부분은 극히 일부가 식용으로 이용될 뿐 막대한 량이 밭에서 폐기되고 있는 실정이다. 본 연구에서 밝혀진 배추 기원 POX의 효소학적 성질은 넓은 작용 pH 및 비교적 높은 열안정성(Fig. 6)을 나타내어 산업적인 이용 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다. 또한 면역학적 성질이 horseradish 기원의 효소와 매우 유사한 것으로 나타나(Fig. 7) horseradish 기원의 효소에 대치될 수 있을 것으로 판단이 된다. 앞으로 배추 기원 효소의 산업적 이용 가능성을 더욱 검토를 하여야 할 것이나 배추 뿌리와 같은 농산 폐기물의 고부가가치성 시약으로의 가공 및 이용을 통하여 농가 소득의 증대를 기대할 수 있을 것이다.

요 약

Peroxidase를 다량 함유하는 식물체를 검색할 목적으로 십자화과 식물 9종에 대하여 효소활성 분포를 조사하였다. 검색한 식물체 중 배추 뿌리에서 본 효소의 활성이 강하게 나타나 배추 뿌리로부터 본 효소의 정제를 행하였다. 정제된 효소는 분자량 50,000의 단량체로서 pH 7.0, 50°C에서 최적 활성을 나타내었다. phenol 및 phenol 유도체가 좋은 기질로 작용하였으며 pyrogallol에 대한 H₂O₂의 Km값은 1.6 mM이었다. 본 효소는 406 nm에서 Soret 흡수대를 나타내어 다른 peroxidase와 마찬가지로 분자내 보결분자단으로 heme을 가지고 있음을 알았다. 정제된 배추 뿌리 기원의 효소는 면역화학적, 전기영동적 성질이 horseradish 기원의 peroxidase와 유사하였다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Klibanov, A.M. and E.D. Morris: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 119 (1981)

2. Carmichael, R.D., P.M. Fedorak and M.A. Pickard: *Biotechnol. Lett.*, **7**, 289 (1985)
3. Klibanov, A.M., T.M. Tu and K.P. Scott: *Science*, **221**, 259 (1983)
4. Paice, M.G., and L. Jurasek: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 477 (1984)
5. Fiessinger, F., S.W. Maloney, J. Manem, and J. Mallevalle: *Aqua*, **2**, 116 (1984)
6. Kennedy, J.F., and J.M.S. Cabral: *Enzyme Technology*, Vol. 7a. VCH Publishers, New York (1987)
7. Martyn, R.P., S.C. Brnzei and G.T. Sperl: *Bios*, **52**, 8 (1981)
8. Neidleman, S.L., and J. Geigert: *Biohalogenation*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1986)
9. Kadima, T.A., and M.A. Pickard: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3473 (1990)
10. Yamada, Y.: *Plant Cell Culture*, Kodansha, Tokyo (1984)
11. Loprasert, S., S. Negoro and H. Okada: *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1971 (1988)
12. Morris, D.R., and L.P. Hager: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1763 (1966)
13. Pickard, M.A., and A. Hashimoto: *Can. J. Microbiol.*, **34**, 998 (1988)
14. Fang, G.H., P. Kenigsberg, M.J. Axley, M. Nuell and L.P. Hager: *Nucleic Acids Res.*, **14**, 8061 (1986)
15. Nuell, M.J., G.H. Fang, M.J. Axley, P. Kenigsberg and L.P. Hager: *J. Bacteriol.*, **170**, 1007 (1988)
16. 이창복: *대한식물도감*, 향문사 (1982)
17. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
18. Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970)
19. Ouchterlony, O.: *Handbook of Experimental Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1967)
20. Velick, S.F. and J. Vavra: *J. Biol. Chem.*, **237**, 2109 (1962)
21. Maldonado, B.A. and R.B. van Huystee: *Can. J. Bot.*, **58**, 2280 (1980)
22. Shannon, L.M., E. Kay and J.W. Lew: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2166 (1966)
23. Glumoff, T., P.J. Harvey, S. Molinari, M. Goble, G. Flank, J.M. Palmer, J.D.G. Smit and M.S.A. Leisola: *Eur. J. Biochem.*, **187**, 515 (1990)
24. Hochman, A. and A. Shemesh: *J. Biol. Chem.*, **262**, 6871 (1987)
25. Lee, S.Y., H.I. Rhee, W.C. Tae, J.C. Shin and B.K. Park: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 542 (1989)
26. Rhee, H.I., K.J. Jeong, B.K. Park, Y.S. Choi and S.Y. Lee: *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 1213 (1991)

(Received September 4, 1991)